昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, February 2005, 48(1): 7 - 12 ISSN 0454-6296

黄粉甲幼虫抗菌物质的诱导及其抗菌活性

黄 文，王芙蓉，刘 彬，王佳璐，周兴苗，雷朝亮*
（华中农业大学昆虫资源研究所，武汉 430070）

摘要：采用饥饿法、紫外线照射法和针刺法处理黄粉甲 *Tenebrio molitor* 6 龄幼虫后均能诱导其产生抗菌物质，收集的血淋巴上清液对真菌有抑制作用，对细菌无抑制作用；经热处理后的血淋巴上清液则对细菌有抑制作用，而对真菌无抑制作用。SDS-PAGE 检测结果发现，与未诱导的对照相比经诱导的黄粉甲幼虫血淋巴中，原有的一类大分子蛋白质如分子量分别为 97 kD、44 kD 和 37 kD 左右的蛋白质缺失；而 ESI-MS 分析结果显示诱导后比诱导前黄粉甲幼虫血淋巴中有小分子物质产生，推测可能是此类缺失蛋白质分解为小分子量的抗菌肽，从而表现出抗菌活性。

关键词：黄粉甲幼虫；抗菌蛋白；抗菌肽；抑菌作用
中图分类号：Q962 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2005)01-0007-06

Inducement and production of antibacterial substances in *Tenebrio molitor* larvae and their antibacterial activity

HUANG Wen, WANG Fu-Rong, LIU Bin, WANG Jia-Lu, ZHOU Xing-Miao, LEI Chao-Liang* (Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Sixth-instar larvae of *Tenebrio molitor* were treated with different inducing methods including starving, radiating with ultraviolet and pricking, and they all could induce the production of antibacterial substances in hemolymph. The supernate of induced hemolymph not treated with heat had inhibitive effect on fungi, but had no effect on bacteria. When the induced hemolymph was heated, the supernate had inhibitive effect on bacteria, but had no effect on fungi. The result of SDS-PAGE showed the original macromolecular proteins, such as those with molecular weights of 97 kD, 44 kD and 37 kD, disappeared in the induced hemolymph compared with the uninduced one. Moreover, the results of ESI-MS showed micromolecular substances appeared in the hemolymph of the *T. molitor* larvae after induction. It was inferred that the disappeared proteins decomposed to micromolecular antibacterial peptides with bactericidal activity.

Key words: *Tenebrio molitor* larvae; antibacterial proteins; antibacterial peptides; antibacterial activity

自从 1962 年 Stephens 等发现大蜡螟 *Galleria mellonella* 幼虫免疫血淋巴中具有一种杀绿脓杆菌的免疫因子起，昆虫体内的这种抗菌物质引起了人们极大的重视，是昆虫学研究领域的热门课题之一。目前为止，已从鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目、半翅目、毛翅目、蜚蠊目和蜻蜓目等 8 个目昆虫中诱导出抗菌物质，已纯化的抗菌物质达 50 多种。

近年来在分子水平的有关抗菌肽的研究主要集中于鳞翅目和双翅目昆虫，其中以天蚕和蝇类的抗菌肽研究尤为深入，对黄粉甲 *Tenebrio molitor* 抗菌肽也有一些研究。以超声波为诱导源诱导黄粉甲，可获得分子量为 4.5 kD 左右的抗菌肽和防卫素（Hoffmann and Hetru, 1992; Lee *et al*., 1996）。王小平等（1998a, 1998b, 2000）研究发现黄粉甲幼虫经大肠杆菌 *Escherichia coli* 诱导可产生抗菌物质，抗菌物质对多种动物和植物病原菌有抑菌作用；他们还采用正交设计 $L_{27}(3^{13})$ 的方法研究了大肠杆菌诱导黄粉甲幼虫产生免疫血淋巴的最佳制样条件，并且发现用大肠杆菌对黄粉甲的不同虫态（成虫、蛹、幼虫）进行诱导，均能诱导其产生抗菌物质。韩润林等

作者简介：黄文，女，1968 年生，博士，华中农业大学食品科技学院副教授，从事昆虫功能性食品和昆虫免疫学研究，E-mail: huangwen@mail.hzau.edu.cn
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: ioir7207@sina.com
收稿日期 Received: 2004-08-18; 接受日期 Accepted: 2004-11-29

(1998)用超声波和饥饿后饲喂大肠杆菌的方式诱导黄粉甲幼虫,诱导产生的抗菌物质都能较好地抑制大肠杆菌 O79 和沙门氏菌 50115,且收集的抗菌物质经 100℃处理 20 min 后抗菌活性基本不变。另外,从黄粉甲中还分离得到 tenecin 和 drosomycin 等抗真菌肽及抗真菌蛋白,这些蛋白都可抵御侵入昆虫体内的病原真菌(Jung *et al.*,1995)。

我们采用不同的诱导方式诱导黄粉甲幼虫产生抗菌物质,观察其抗菌蛋白和抗菌肽的抑菌活性,并初步探讨黄粉甲抗菌肽诱导产生的可能途径。

1 材料与方法

1.1 试虫、菌种及培养

黄粉甲 6 龄幼虫由华中农业大学昆虫资源研究所养虫室提供。

诱导菌种大肠杆菌由华中农业大学生命科学研究院菌种保藏室提供,将其接入固体 LB 平板,0~4℃低温保藏,用前活化。指示菌种:大肠杆菌同上,金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 由华中师范大学水生生物学重点实验室提供,苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 由华中农业大学牧医学院提供;0~4℃固体平板保藏,用前活化,取一环于 150 mL LB 液体培养基中,37℃培养过夜。植物病原真菌由华中农业大学植物病理实验室提供,于固体马铃薯培养基平板 28℃培养。

1.2 主要仪器

电喷雾质谱仪为安捷伦公司的 1100 Trap VL;ES 离子源,采用直接进样方式。

1.3 诱导方法

1.3.1 饥饿法:将黄粉甲幼虫饥饿 1 天后,饲喂含大肠杆菌的饲料 3 天,再饲喂青菜叶 1 天。

1.3.2 紫外照射法:将黄粉甲幼虫放入直径为 18 cm 的大培养皿中,均匀摊开,用功率为 50 W 的紫外灯照射,距离地面 2 m,照射时间 0.5 h,24 h 后再照射 1 次,饲喂青菜叶 1 天。

1.3.3 针刺法:用针刺破黄粉甲幼虫的体壁后,投入大肠杆菌悬浮液中浸泡 10 s,取出,3 天后再饲喂青菜叶 1 天。

1.4 血淋巴收集及热处理

对照组不进行诱导,实验组经不同诱导方法诱导,再分别用 75%的乙醇溶液对虫体进行喷洒消毒后,低温下剪掉黄粉甲幼虫的 2 条前足,用毛细管采集血淋巴,于 4℃ 10 625×g 离心 20 min,收集上清液置冰箱保存备用。

将血淋巴上清液置 100℃沸水浴中加热 20 min,于 10 625×g 离心 20 min,收集上清液置冰箱保存备用。

1.5 抗菌活性测定

(1)抗细菌实验:参照 Hultmark 等(1980)抑菌圈法,滤纸片直径为 0.6 cm。(2)抗真菌实验:采用生长抑制测定法。在马铃薯培养基平板的中央处打孔或贴滤纸片,在孔中或滤纸片上加 5 μL 血淋巴样品,并于距离中央 1 cm 处对称接种真菌菌丝,观察内外两侧菌丝生长半径的差异。抑菌效果(%)=(外侧菌丝扩展半径-内侧菌丝扩展半径)/外侧菌丝扩展半径×100%。

1.6 血淋巴中蛋白质的电泳分析

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法。分离胶浓度为 10%,pH 8.9,Tris-Gly 缓冲系统。考马斯亮蓝 R-250 染色,10%冰乙酸溶液脱色。

1.7 血淋巴热处理上清液的 ESI-MS 分析

血淋巴上清液经热处理后,将其溶解于含 0.1%甲酸的 50%乙腈水溶液,使终浓度为 10%,然后进行 ESI-MS 分析。

2 结果与分析

2.1 免疫血淋巴的抑菌作用

2.1.1 血淋巴热处理上清液的抑菌作用:将饥饿法和紫外线照射等方法诱导的血淋巴加热处理,离心处理除去大分子物质。血淋巴热处理上清液经电泳检测,不含 10 kD 分子量以上的蛋白质。

由表 1 可知,采用饥饿法和紫外线照射法可诱导黄粉甲幼虫产生抗菌物质,其血淋巴热处理上清液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有抑制作用,抑菌圈的直径分别为 1.2 cm、1.2 cm、1.0 cm 和 0.9 cm,但对苏云金芽孢杆菌没有抑制作用。

图 1 为黄粉甲幼虫血淋巴热处理上清液对真菌葡萄白腐菌抑制作用的结果,对其他供试真菌抑制作用的实验结果与其相同。由此推断血淋巴热处理上清液中不存在抗真菌肽或者是抗真菌肽对热敏感,经热处理后变性而失去活性。

2.1.2 血淋巴上清液的抑菌作用:经饥饿法诱导的黄粉甲幼虫血淋巴上清液对植物病原真菌的抑制作用结果见表 2。实验结果显示,血淋巴上清液对植物病原真菌具有明显的抑制作用,其抑菌效果如表 2 和图 2 所示。未经诱导的血淋巴对供试真菌均无抑制作用。

表 1　黄粉甲幼虫血淋巴热处理上清液的抑菌作用

Table 1　Bactericidal effect of the supernate of the heated hemolymph in *Tenebrio molitor* larvae

供试细菌 Tested bacteria	诱导方法 Inducing methods	抑菌圈直径(cm) Diameter of antibacterial cycle	抑菌效果 Bactericidal effect
	对照 CK	0.6	-
大肠杆菌 *Escherichia coli*	饥饿法 Starving	1.2	+
	紫外线照射法 Radiating with ultraviolet	1.2	+
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	饥饿法 Starving	1.0	+
	紫外线照射法 Radiating with ultraviolet	0.9	+
苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*	饥饿法 Starving	0.6	-
	紫外线照射法 Radiating with ultraviolet	0.6	-

"＋"具有抑菌效果 With bactericidal effect；"－"没有抑菌效果 Without bactericidal effect.

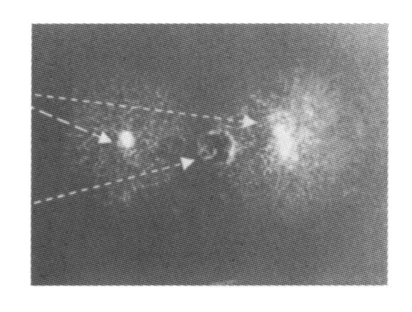


图 1　打孔法检测饥饿法诱导的黄粉甲幼虫血淋巴热处理上清液对葡萄白腐菌的抑制作用

Fig. 1　Bactericidal effect of the supernate of the heated hemolymph in *Tenebrio molitor* larvae induced by starving on *Coniella diplodiella* was measured with the method of agar-holing

与血淋巴热处理上清液相比(图 1)，血淋巴上清液对植物病原真菌有很好的抑制作用，尤其是对葡萄白腐菌(图 2)，其抑制率高达 54.5%，这对于未经纯化的血淋巴来说是相当高的。但血淋巴上清液并非对所有的真菌都有抑制作用(如油菜菌核)，并且对不同的真菌其抑制率相差较大。由此可知，经诱导的黄粉甲幼虫血淋巴中存在抗真菌物质，而此抗真菌物质的化学成分需进一步研究。

多次实验表明血淋巴上清液对实验所用的细菌指示菌抑制作用均不明显，这与血淋巴热处理上清液实验结果不一致。

2.2　血淋巴中蛋白质成分的电泳分析

采用饥饿法、紫外线照射法和针刺法分别诱导黄粉甲幼虫，在上样量完全相同的情况下，将诱导后的血淋巴上清液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，结果见图 3。

表 2　黄粉甲幼虫血淋巴上清液对植物病原真菌的抑制作用

Table 2　Bactericidal effect on plant pathogenic fungus of the supernate of the hemolymph from *Tenebrio molitor* larvae

指示菌 Fungus	外侧菌丝扩展半径 Semidiameter (cm)	内侧菌丝扩展半径 Semidiameter (cm)	抑菌效果 Effect of antibacterial (%)
葡萄白腐菌 *Coniella diplodiella*	1.1	0.5	54.5
西瓜蔓枯菌 *Mycosphaerella melonis*	1.0	0.6	40.0
西瓜枯萎菌 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*	1.1	0.65	40.9
番茄叶霉菌 *Fulvia fulva*	1.1	0.7	36.3
柑橘青霉 *Penicillium italicum*	0.7	0.45	34.3
油菜菌核 *Sclerotinia sclerotiorum*	0.3	0.3	0

由图 3 可知，与对照血淋巴样品(A)相比，经紫外线照射法(C)和针刺法(D)诱导的血淋巴样品分别增加了一条深浅不等、分子量约为 43 kD 的蛋白带，经 3 种方法诱导的血淋巴都缺失了分子量约为 97 kD 的蛋白带；饥饿法(B)诱导的血淋巴中蛋白质变化最大，不仅缺失了分子量约为 97 kD 的蛋白带，还缺失了分子量为 44 kD 和 37 kD 左右的蛋白带，并且 31 kD 左右的蛋白带变浅；紫外线照射法诱导的血淋巴中分子量为 31 kD 和 37 kD 左右的蛋白也有逐渐减少的趋势。由此说明黄粉甲幼虫在不同诱导方式下，所表达的蛋白质及其含量与未经诱导的黄粉甲相比有所增减，并且不同诱导方式之间也不一样。特别是饥饿诱导法所表达的蛋白质变化最大，这与其血淋巴抗真菌活性最高是一致的。

2.3　质谱分析血淋巴热处理上清液成分

采用 ESI-MS 分别测定和分析经诱导和未经诱导的黄粉甲幼虫血淋巴热处理上清液的成分，结果(图 4)显示：在 750 ~ 1 500 范围内，诱导处理明显

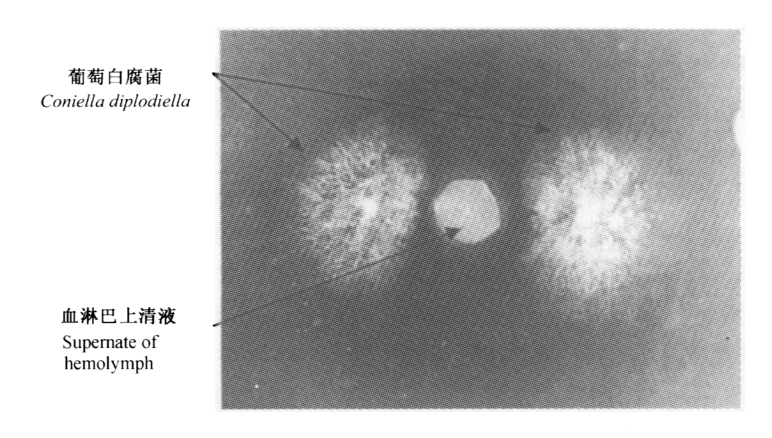


图2 滤纸片法检测饥饿法诱导血淋巴上清液对葡萄白腐菌的抑制作用

Fig. 2 Bactericidal effect of the supernate of the hemolymph induced by starving in *C. diplodiella* measured with the method of filter paper patch

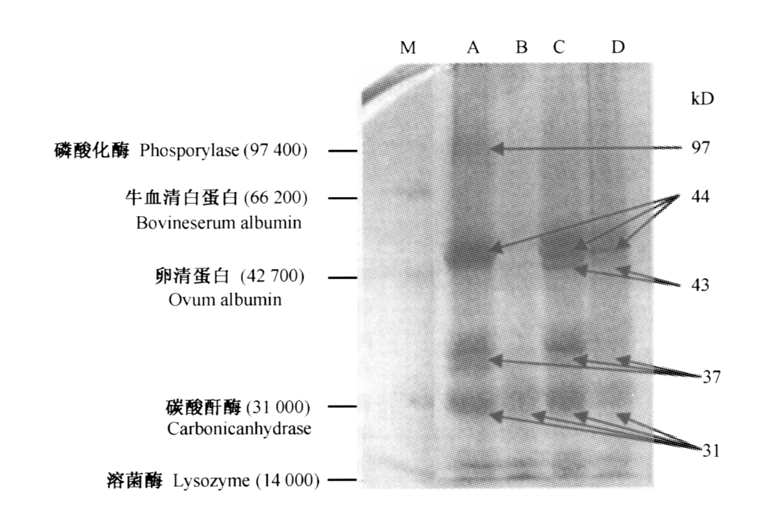


图3 不同诱导方式的血淋巴上清液 SDS-PAGE 结果

Fig. 3 SDS-PAGE of the supernate of hemolymph induced by different methods

M：蛋白质分子量标准 The standard molecular weight of protein；A：未经诱导 Uninduced；B：饥饿法 Starving；C：紫外线照射法 Radiating with ultraviolet；D：针刺法 Pricking.

比未诱导处理多出几个分子离子峰(可能是多电荷分子离子峰)，由此说明，经过诱导的黄粉甲幼虫血淋巴中增加了相当数量的相对分子量在 800～4 000 D 范围的物质。这些物质有可能包括几种抗菌肽物质。

3 讨论

3.1 关于黄粉甲的抗菌物质

最近几十年来，很多实验都证明昆虫经诱导后能产生抗菌物质，且具有广谱的抗菌活性。黄粉甲幼虫血淋巴热处理上清液对供试的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有抑制作用，说明其中存在抗菌肽，并且对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌都有作用，但是这些抗菌肽对有杀虫作用的苏云金芽孢杆菌却没有抑制作用。

Boman 等(1981, 1991)在研究抗菌肽分子 N 端时发现每间隔 1 到 2 个氨基酸残基就有 1～2 个亲水性残基，这种序列极易形成两亲螺旋，是其具有抗菌活性的一个共同特征。研究表明(Andersons *et al*., 1991; Fehlbaum *et al*., 1996)抗菌肽在水溶性环境里没有稳定的构象，只是在结合上或接近细胞膜时才形成其发挥功能的高级结构，这可能也是抗菌肽具有很高的热稳定性的原因。从抑菌实验结果来看，加热处理的黄粉甲血淋巴上清液对供试细菌有抑制作用，表明了黄粉甲抗菌肽的抑菌活性对热非常稳定，而未加热的血淋巴不表现出抗细菌的活性，

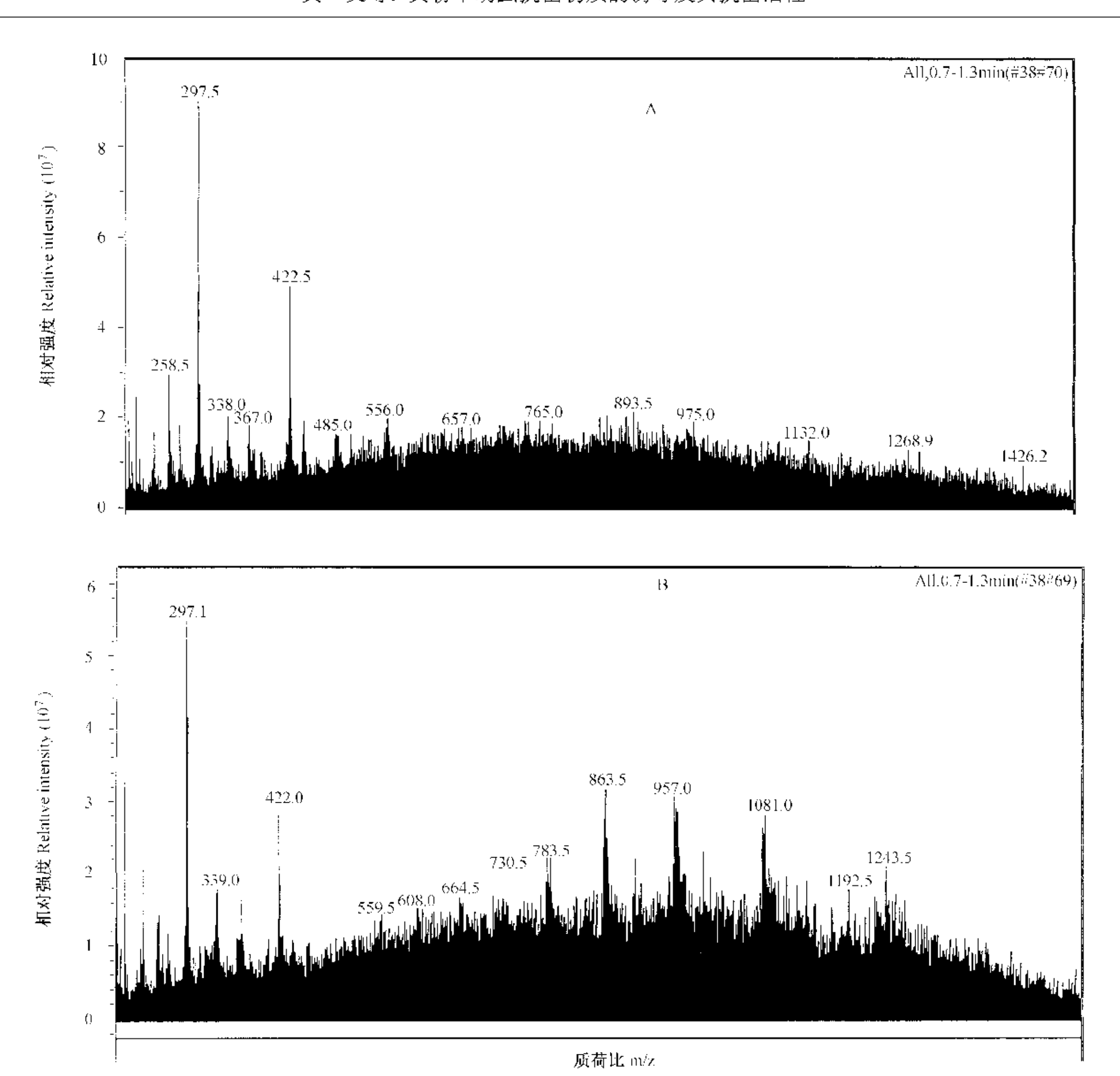


图 4　未经诱导(A)和诱导(B)的黄粉甲幼虫血淋巴热处理上清液的 ESI-MS 图谱

Fig. 4　ESI-MS of the supernate of the hemolymph from the uninduced (A) and induced (B) *Tenebrio molitor* larvae

由此推测其抗菌肽的构型以及作用形式(氧化型或还原型)在发挥抗菌作用的过程中是非常关键的,并且易受到血淋巴中蛋白质或其他因素的影响而丧失活性。

黄粉甲幼虫经诱导产生的抗菌肽可以抑制细菌,但对真菌几乎无任何作用;诱导抗菌肽的同时,黄粉甲幼虫还可以产生活性较高的抗真菌蛋白,这种抗真菌蛋白的抗细菌能力却有限。因此认为黄粉甲在受到外来入侵时,其免疫体系可产生多种抗菌物质分别抵抗外来入侵的细菌和真菌。

3.2　黄粉甲幼虫抗菌物质的诱导方式

一般认为昆虫的体液免疫为“非专一性”,不同的诱导源作用后，都能在昆虫血淋巴中检测到相似的抗菌肽(宫霞等，2004)。本研究却显示,不同的诱导源作用后虽都可产生抗菌肽和抗菌蛋白,但产生的机制可能有所不同,至少在程度上大不相同。采用饥饿法和紫外线照射法同样可获得抗菌物质,但在操作处理上较针刺法大为简化,适合大规模诱导昆虫。

3.3　黄粉甲幼虫经诱导产生抗菌物质的可能途径

关于抗菌肽生物合成的调控,一般认为昆虫抗菌肽是由 62～64 个氨基酸残基组成的前体,由多种酶加工而来的,这些前体都含有信号肽,C 端有 Gly,信号肽与成熟肽间还有一段氨基酸序列(Diamond *et al*.，2000;徐进署，2002)。

我们在研究抗菌肽产生的途径时发现与未经诱导的血淋巴相比,经诱导的血淋巴不仅有多出的蛋白带,也发生缺失蛋白带的现象;与此同时经诱导加

热处理的血淋巴却又增加了一些小分子抗菌肽物质。由此提出假设，黄粉甲幼虫经诱导产生抗菌肽的可能途径之一是黄粉甲在受到外来入侵时，激活其免疫体系，产生一系列酶分解血淋巴中的某些蛋白质为抗菌肽。抗菌肽前体可能隐藏在这些序列和结构相应的缺失蛋白质中。

参 考 文 献 (References)

Andersons D, Steiner H, 1991. Biologically active and amidated cecropin produced in a baculovirus expression system from a fusion construct containing the antibody-binding part of protein A. *Biochem. J.*, 280: 219 - 224.

Boman HG, Lee JY, 1991. Cell-free immunity in cecropia A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.*, 201: 23 - 31.

Boman HG, Steiner H, 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292: 246 - 247.

Diamond G, Kaiser V, 2000. Transcriptional regulation of β-defensin gene expression on tracheal epithelial cells. *Infect Immun.*, 68: 113.

Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1 221 - 1 225.

Gong X, Shi YH, Le GW, 2004. Purification of antimicrobial peptide MDL1 from *Musca domestica* larvae and its effect on *Escherichia coli* ultrastructure. *Acta Entomologica Sinica*, 47(1): 8 - 13. [宫霞，施用晖，乐国伟，2004. 家蝇幼虫抗菌肽 MDL1 的分离纯化及其对大肠杆菌超微结构的影响. 昆虫学报，47(1): 8 - 13]

Han RL, Sun QL, Eer DF, Li LM, 1998. Studies on induction and activity of antibacterial peptides in the larvae of *Tenebrio molitor*. *Journal of Inner Mongolia Institute of Agriculture and Animal Husbandry*, 19(3): 114 - 117. [韩润林，孙庆林，额尔敦夫，李立民，1998. 黄粉甲幼虫抗菌肽的诱导及其抗菌活性的初步研究. 内蒙古农牧学院学报，19(3): 114 - 117]

Hlultmark D, Steiner H, Rasmusson T, Boman HG, 1980. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bacterial proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, 106: 7 - 16.

Hoffmann JA, Hetru C, 1992. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol. Today*, 13(10): 411 - 415.

Jung YH, Park BY, Lee DK, Hahn YS, Chung J, 1995. Biochemical and molecular characterization of an antifungal protein from *Tenebrio molitor*. *Mol. Cell Biol.*, 5: 292 - 298.

Lee YJ, Chung TJ, Park CW, Hahn Y, Chung JH, Lee BL, Han DM, Jung YH, Kim S, Lee Y, 1996. Structúre and expression of the tenecin 3 gene in *Tenebrio molitor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 218 (1): 6 - 11.

Otvos LJ, 2002. The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 1 138 - 1 150.

Wang XP, Xu GJ, 1998. The determination of the best sample preparation of the immune hemolymph in *Tenebrio molitor* larvae. *J. Huazhong Agri. Univer.*, 17(5): 442 - 446. [王小平，徐冠军，1998. 黄粉虫幼虫免疫血淋巴最佳制样条件的确定. 华中农业大学学报，17(5): 442 - 446]

Wang XP, Xu GJ, Liu YL, 1998. Study on the antibacterial substances of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae. *J. Huazhong Agri. Univer.*, 17(6): 534 - 536. [王小平，徐冠军，刘毅琳，1998. 黄粉虫幼虫抗菌物质的抑菌作用研究. 华中农业大学学报，17(6): 534 - 536]

Wang XP, Xu GJ, Wang ZX, 2000. The kinetics of inducible antibacterial substance from yellow mealworm (*Tenebrio molitor*). *J. Huazhong Agri. Univer.*, 19(3): 223 - 226. [王小平，徐冠军，汪忠信，2000. 大肠杆菌对黄粉虫不同虫态诱导动力学的研究. 华中农业大学学报，19(3): 223 - 226]

Xu JS, Zhang SQ, 2002. Advances in the research of the functions of insect antibacterial peptides against pathogenic organisms. *Acta Entomologica Sinica*, 45(5): 673 - 678. [徐进署，张双全，2002. 昆虫抗菌肽对病原微生物作用的研究进展. 昆虫学报，45(5): 673 - 678]

(责任编辑：黄玲巧)